

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861336

研究課題名(和文) microRNAは子宮内膜症間質細胞の病態形成に関与する

研究課題名(英文) microRNA is involved in the pathogenesis of endometriosis.

研究代表者

阿部 若菜 (ABE, WAKANA)

大分大学・医学部・病院特任助教

研究者番号：30457618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜症におけるmiR-503の役割について検討した。子宮内膜症間質細胞(ECSCs)では、microRNA(miRNA)の発現異常が生じていることが分かった。子宮内膜症ではmiR-503の発現減少により、ECSCsの増殖および血管新生は亢進し、apoptosis抵抗性となることが示唆された。子宮内膜症でBcl-2、VEGF-AおよびCyclin D1の発現が増加している原因として、miR-503による作用が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Utilizing miRNA microarray analysis, we found 8 downregulated miRNAs and 4 upregulated miRNAs in cultured ECSCs. Compulsory expression of miR-503 directed the inhibition of cell proliferation and the induction of apoptosis in ECSCs. miR-503 was found to suppress the mRNA expression of Bcl-2, VEGF-A and Cyclin D1 in ECSCs.

研究分野：産婦人科学

キーワード：子宮内膜症 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症のない正常女性では、月経時に腹腔内に逆流した子宮内膜細胞は apoptosis に陥る。しかし、子宮内膜症では apoptosis が減少し、子宮内膜細胞が異所性に生存・生着すると考えられている。したがって、子宮内膜症では、子宮内膜症細胞の増殖能・生存能の亢進 (apoptosis 耐性) が起こり、それが子宮内膜症の病態の核心をなすものと考えられる。

また近年、様々な疾患の発症にエピジェネティック異常の関与が明らかとなっており、遺伝子発現制御に microRNA (miRNA) が重要な働きをすることが相次いで報告されている。miRNA は 22 塩基程度の non-coding RNA で、蛋白質をコードする遺伝子全体の約 30% が miRNA による転写後制御を受けているとの報告もある。miRNA は発生、分化、癌化などにおいて様々な役割を果たすことが近年明らかとなっており、子宮内膜症においても miRNA の発現異常が報告されている。

2. 研究の目的

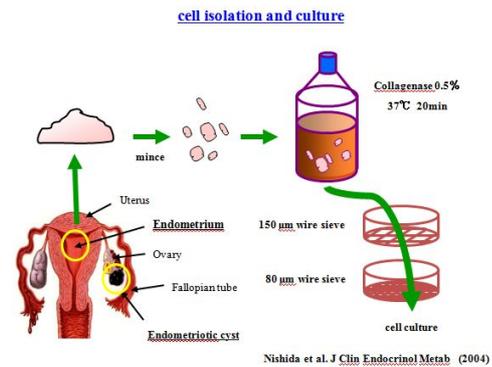
我々は培養子宮内膜症間質細胞 (ECSCs) と正常子宮内膜間質細胞 (NESC) における mRNA ならびに miRNA の発現を microarray (Agilent 社製) を用いて網羅的に解析し、NESC と ECSCs において発現変化する mRNA ならびに miRNA を抽出し、その中から ECSCs で異常発現する 12 個の miRNA を抽出し、さらにクラスター解析によって、NESC と ECSCs では発現パターンが明らかに異なることを発見している。ECSCs で発現が減少している miRNA は 8 つ、発現が増加している miRNA は 4 つだった。

ECSCs で発現が低下している miRNA 群のうち、miR-503 について、子宮内膜症の病態形成における役割の解明を目的とした。miR-503 は、B-cell leukemia/lymphoma 2 (Bcl-2)、vascular endothelial growth factor A (VEGF-A)、cyclin D1 に作用することが既に

分かっている。

3. 研究の方法

患者より文書による同意を得て採取した、子宮筋腫および卵巣子宮内膜症性嚢胞の手術検体から NESC と ECSC を分離・培養した。



ECSCs および NESC から total RNA を抽出し、microRNA microarray による網羅的解析を行った。NESC と比較して、ECSCs で有意に発現が増加または減少している 12 個の miRNA を抽出し、NESC と比較して、ECSCs で発現が減少している miRNA は 8 つ、発現が増加している miRNA のうち、miR-196b、miR-503、miR-424 は、その遺伝子が CpG island に存在しており、DNA のメチル化によって内膜症で発現が抑制されている可能性があると考えられた。これら 3 つの miRNA のうち、内膜症の病態に関わる可能性がある miRNA として、miR-503 について検討した。

miRNAs expressed between ECSCs and NESC

Eight miRNAs downregulated in ECSCs compared with NESC.

| Systemic name | Raw P value | FDR-adjusted P value | Fold change | Accession No. |
|--------------------|-----------------|----------------------|-------------|---------------------|
| hsa-miR-199b-5p | 0.00195 | 0.0397 | 0.08 | MIMAT0000263 |
| hsa-miR-503 | 0.000778 | 0.107397 | 0.22 | MIMAT0002874 |
| hsa-miR-424 | 0.00232 | 0.107397 | 0.26 | MIMAT0001341 |
| hsa-miR-196b | 0.00777 | 0.200067 | 0.29 | MIMAT0001080 |
| hsa-miR-199a-3p | 0.0209 | 0.227034 | 0.41 | MIMAT0000232 |
| hsa-miR-214 | 0.0209 | 0.227034 | 0.46 | MIMAT0000271 |
| hsa-miR-29b | 0.0117 | 0.216796 | 0.48 | MIMAT0000100 |
| hsa-miR-455-3p | 0.0209 | 0.227034 | 0.49 | MIMAT0004784 |

Four miRNAs upregulated in ECSCs compared with NESC.

| Systemic name | Raw P value | FDR-adjusted P value | Fold change | Accession No. |
|---------------|-------------|----------------------|-------------|---------------|
| hsa-miR-210 | 0.00865 | 0.200067 | 4.30 | MIMAT0000267 |
| hsa-miR-100 | 0.0274 | 0.241585 | 3.57 | MIMAT0000098 |
| hsa-miR-132* | 0.0206 | 0.227034 | 2.17 | MIMAT0004594 |
| hsa-miR-181a | 0.00232 | 0.107397 | 2.16 | MIMAT0000256 |

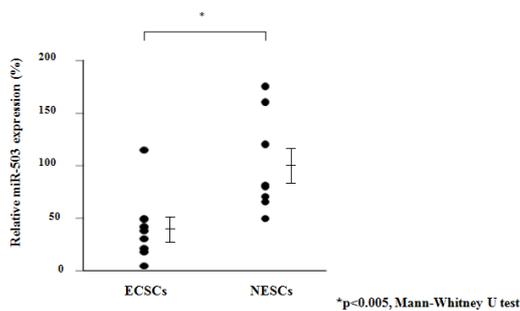
続いて、miRNA microarray での解析結果をさらに定量的に確認するため、real-time PCR を施行した。

また、遺伝子導入により、miR-503 を ECSCs に強制発現させ、細胞増殖については MTS assay、BrdU assay を、apoptosis については Cell Death Detection ELISA、Caspase 3/7 activity を、そして Bcl-2、VEGF-A、cyclin D1 mRNA の発現について検討した。

4. 研究成果

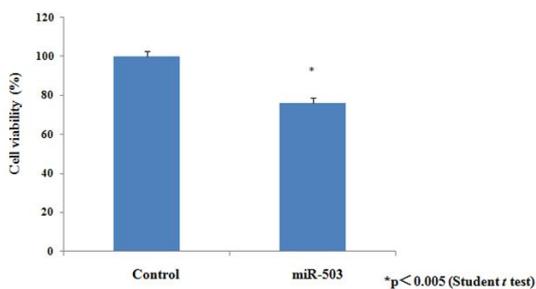
Microarray に用いた RNA で real-time PCR を施行し、miR-503 の発現を確認したところ、NECs と比較して ECSCs で miR-503 の発現が有意に低下していた。

real-time RT-PCR (miR-503)



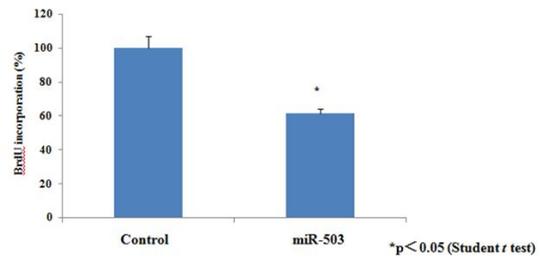
miR-503 を transfection した ECSCs を 72 時間培養後、MTS assay を施行した。Control 群と比較して miR-503 群で有意に生細胞数が少ないことが分かった。

MTS assay



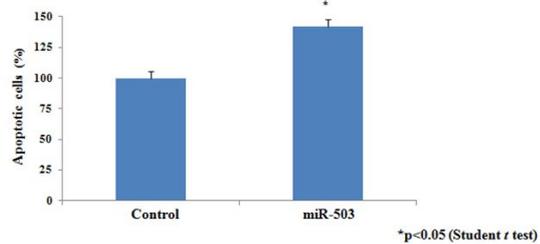
同様に培養後、BrdU assay を行い、Control 群と比較して miR-503 群で有意に細胞増殖が低いことが分かった。

BrdU incorporation assay



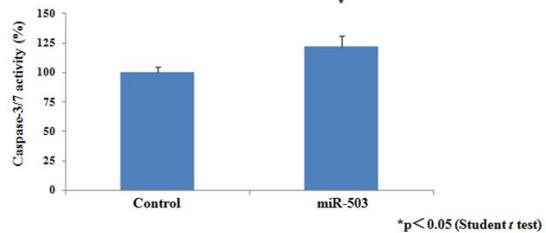
同様に培養後、Cell death detection ELISA では、Control 群と比較して、miR-503 群で apoptosis を起こしている細胞が有意に多いことが分かった。

Cell Death Detection ELISA



同様に培養後、Control 群と比較して、miR-503 群で有意に caspase 活性が高いことが分かった。

Caspase 3/7 activity

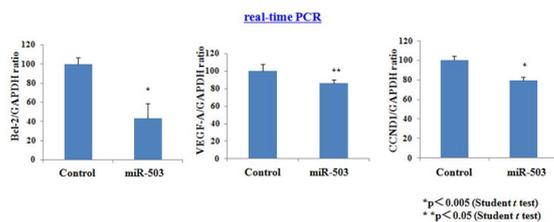


続いて、miR-503 を transfection した ECSCs を 48 時間培養後、RNA を採取し、real time PCR で Bcl-2 の発現を確認した。Control 群と比較して、miR-503 群で Bcl-2 の発現が有意に低下していた。

同様に、real time PCR で VEGF-A の発現を確認した。Control 群と比較して、miR-503 群で VEGF の発現が有意に低下していた。

同様に、real time PCR で Cyclin D1 の発現を確認した。Control 群と比較して、miR-503

群で Cyclin D1 の発現が有意に低下していた。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

阿部若菜、子宮内膜症間質細胞では miR-503 の発現が低下し、その増殖促進と apoptosis 抵抗性に関する、第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会、2014 年 4 月 18 日、東京国際フォーラム (東京都千代田区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 若菜 (ABE, WAKANA)

大分大学・医学部・病院特任助教
研究者番号：30457618

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()